

公表特許公報(A)

昭63-500805

公表 昭和63年(1988)3月24日

INT. CL. ⁴	識別記号	庁内整理番号	審査請求 未請求	予備審査請求 未請求	部門(区分)
C 08 B 37/00 A 51 K 31/725	ADU ADZ	C-6778-4C 7252-4C 7252-4C C-8515-4B※			3(3)
C 12 P 19/04					(全 25 頁)

発明の名称 可溶性リン酸化グルカン

特 願 昭61-504604

出 願 昭61(1986)8月13日

翻訳文提出日 昭62(1987)4月20日

国 際 出 願 PCT/US86/01646

国際公開番号 WO87/01037

国際公開日 昭62(1987)2月26日

優先権主張 ①1985年8月19日②米国(U.S.)③767388

発 明 者 ジ ルジオ、ニコラス アール アメリカ合衆国 ルイジアナ州 70066 グレタナ フェアフィールド アベニュー 732

出 願 人 ジ アドミニストレイターズ アメリカ合衆国 ルイジアナ州 70012, ニューオールリーonz テ
オブザ ユーレン エデュ ユーレン アベニュー 1430
ケイシヨナル フアンド

代理人 弁護士 八田 幹雄 外1名

指定国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許)

最終頁に続く

特 許 の 範 囲

- (a) 水または水性溶液への溶解能力;
(b) 非毒性、非免疫抗原性および実質的非発熱性
および
(c) 動物またはヒトにインビボ投与された際に顕著な免疫バイオロジー反応を及ぼす能力
を特徴とするリン酸化ポリマー[β-(1-3)グルコピラノース]鎖から成る可溶性グルカン。
2. 核磁気共鳴スペクトロスコピーで測定された時に実質的に完全な三重らせん鎖がないことをさらに特徴とする請求の範囲第1項に記載の可溶性グルカン。
3. リン酸化度が約1.4%〜約3.4%の範囲であることをさらに特徴とする請求の範囲第1項に記載の可溶性グルカン。
4. 分子量が約10,000〜約100,000ダルトンの範囲であることをさらに特徴とする請求の範囲第1項に記載の可溶性グルカン。
5. 分子量が約100,000〜約500,000ダルトンの範囲であることをさらに特徴とする請求の範囲第1項に記載の可溶性グルカン。
6. 可溶性グルカンが微生物源から得られる請求の範囲第1項に記載の可溶性グルカン。
7. 微生物源がサッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)から成る請求の範囲第6項に記載の可溶性グルカン。

性グルカン。

8. 微生物源がコリオラス ベルシカラー(Coriolis versicolor)から成る請求の範囲第6項に記載の可溶性グルカン。

9. (a) 水または水性溶液への溶解能力;

(b) 非毒性、非免疫抗原性および実質的非発熱性
および

(c) 水溶液中で動物またはヒトにインビボ投与された際に顕著な免疫バイオロジー反応を及ぼす能力

を特徴とするリン酸化ポリマー[β-(1-3)グルコピラノース]鎖から成る組成物。

10. ポリマー[β-(1-3)グルコピラノース]鎖は核磁気共鳴スペクトロスコピーで測定された時に実質的に完全な三重らせん鎖を有しないことをさらに特徴とする請求の範囲第9項に記載の組成物。

11. ポリマー[β-(1-3)グルコピラノース]鎖のリン酸化度が約1.4%〜約3.4%の範囲であることをさらに特徴とする請求の範囲第9項に記載の組成物。

12. ポリマー[β-(1-3)グルコピラノース]鎖の分子量が約10,000〜約100,000ダルトンの範囲であることをさらに特徴とする請求の範囲第9項に記載の組成物。

13. ポリマー[β-(1-3)グルコピラノース]鎖の分子量が約100,000〜約500,000ダルトンの範囲で

あることをさらに特徴とする請求の範囲第9項に記載の組成物。

14. 組成物が微生物から得られる請求の範囲第9項に記載の組成物。

15. 微生物がサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から成る請求の範囲第14項に記載の組成物。

16. 微生物がコリオラス・ベルシカラー (*Coriolus versicolor*) から成る請求の範囲第14項に記載の組成物。

17. 請求の範囲第1項に記載の液剤上または予防上の有効量の可溶性グルカンおよび生理学的に許容可能な媒体から成ることを特徴とする動物またはヒトにおける感染の予防または処置用剤組成物。

18. 感染に対して有効なバイオ活性剤をさらに含有する請求の範囲第17項に記載の組成物。

19. 請求の範囲第1項に記載の液剤上有効量の可溶性グルカンおよび生理学的に許容可能な媒体から成ることを特徴とする動物またはヒトにおける感染新生物増殖阻害剤組成物。

20. 抗腐剤をさらに含有する請求の範囲第19項に記載の組成物。

21. 抗腐剤がシクロホスファミドからなる請求の範囲第20項に記載の組成物。

22. (a) 微粒子グルカンまたはグルカンタンパク質複

合体を強力オトロピック剤を含む高粘性媒体に溶解し、

(b) 合成された溶解グルカンをリン酸と反応させて可溶性リン酸化グルカンを形成させ、そして

(c) その反応混合物から合成された可溶性リン酸化グルカンを回収することを特徴とする

動物またはヒトにインビボ投与された際に顕著な免疫バイオロジー反応を及ぼす非毒性、非免疫反応性、実質的に非発熱性の可溶性リン酸化グルカンの調製方法。

23. 高粘性媒体がジメチルスルフォキシドから成る請求の範囲第22項に記載の方法。

24. 強力オトロピック剤が原液から成る請求の範囲第22項に記載の方法。

25. (a) 微粒子グルカンまたはグルカンタンパク質複合体を強力オトロピック剤を含有する高粘性媒体に懸濁させて混合物を形成させ、

(b) その混合物を約50〜150℃に加熱し、

(c) リン酸をその混合物に加え、

(d) その混合物を50〜150℃で約1〜12時間反応させる連続段階からなる方法により微粒子グルカンまたはグルカンタンパク質複合体を溶解させる請求の範囲第22項に記載の方法。

26. その混合物を約100℃に加熱させる請求の範囲第25項に記載の方法。

27. その混合物がジメチルスルフォキシド中に約4〜12Mの濃度を含む請求の範囲第25項に記載の方法。

28. 合成された可溶性リン酸化グルカンのリン酸化度が実質的に完全なようにグルカンはリン酸と十分な両端反応させられる請求の範囲第22項に記載の方法。

29. (a) 可溶性リン酸化グルカンを沈降させ、
(b) 十分量の水を加えて沈降可溶性リン酸化グルカンを懸濁させ、そして、
(c) 約10,000ダルトン分子量以下の全成分を除去させる

ことにより可溶性リン酸化グルカンを回収する請求の範囲第22項に記載の方法。

30. 微粒子グルカンがサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) から得られる請求の範囲第22項に記載の方法。

31. グルカンタンパク質複合体がコリオラス・ベルシカラー (*Coriolus versicolor*) から得られる請求の範囲第22項に記載の方法。

32. (a) アリコートの菌類細胞を水酸化水溶液に懸濁させて混合物を形成し、

(b) その混合物を約50〜150℃に加熱し、

(c) 生じた懸濁液から上澄を除去し、

(d) 懸濁液を水酸化水溶液に懸濁させ、

(e) ステップ (b) および (c) を2または3回

繰返し、

(f) 上澄をステップ (e) の懸濁液に加えて懸濁液混合物を形成させ、

(g) 懸濁液混合物を加熱し、

(h) 上澄を除去し、

(i) ステップ (f) と (g) を2回繰返し、

(j) 懸濁液を水洗し、

(k) 懸濁液を上澄が実質的に無色となるまでエタノールで繰返し洗浄し、そして

(e) 形成された非可溶性ポリグルコースを単離する

ステップから成る方法により微粒子グルカンを得る請求の範囲第22項に記載の方法。

33. 請求の範囲第1項に記載の液剤上有効量の可溶性リン酸化グルカンを動物またはヒトに投与することを特徴とする動物またはヒトにおける感染処置液。

34. 感染が細菌によって起こされる請求の範囲第33項に記載の方法。

35. 細菌がスタフィロコッカス・アウレウス (*Staphylococcus aureus*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*)、マイコバクテリウム・チューバーコロシス (*Mycobacterium tuberculosis*)、ヘモフィルス・インフルエンゼ (*Haemophilus influenzae*)、ディプロコッカス・ニューモニエ (*Diplococcus pneumoniae*)、エ

因子のインビトロ生産方法。

65. 請求の範囲第63項または64項の記載に従って生産された可溶性細胞壁成分/細胞増殖抑制因子。

可溶性リン酸化グルカン

1. 技術分野

本発明は、新規クラスの可溶性グルカン類に関する。更に詳しくは、本発明は、サッカロミセスセレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) およびコリオラスベルシカラー (*Corleus versicolor*) のような各種微生物から新規可溶性リン酸化グルカン類を調製する方法のほかにポリ- β -(1-3)グルコピラノース類が種々の程度にリン酸化されている可溶性リン酸化グルカン類に関する。本発明の新規可溶性リン酸化グルカン類は、非毒性、非抗原性、実質的に非熱感であり、動物およびヒトにインビロ (in vivo) 投与される際は顕著な免疫バイオロジー的応答を示し、そしてその最も著しい活性が他の免疫活性細胞の活性化を生じさせるマクロファージ活性の免疫刺激である。さらに、これら可溶性リン酸化グルカン類は、インビロ (in vivo) でリンパ性白血病に対すると同様にインビロで腫瘍および肉腫に対して増殖抑制作用を示す。

2. 背景技術

「グルカン」と称する言葉は、セルロース、アミロース、グリコゲン、ラミナリアン類 (Laminarians)、デンプン等のポリマー類を含有する、各種の天然に生ずるホモ多糖類

またはポリグルコース類を一般に対象とする。グルカンは、またはは3型のいずれかである 1-3、1-4、および 1-6 のグルコシド結合によりリンクされた分枝または非分枝鎖のグルコース単位を含む。

ここで定義するように、「微粒子グルカン」は、イーストサッカロミセスセレビシエの細胞壁から誘導されたような非水溶性微粒子 (約 1~3 μ) ポリグルコースを示す。微粒子グルカンは、巨大分子であり、かつ一連の β -(1-3) グルコシド結合により単位化された鎖状グルコピラノース単位から成っている。[ハッシュド等., 1941, ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティ 63: 295~298頁; フルジョ等., 1979, インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー 24: 773~779頁 (Hashid et al., 1941, J. Amer. Chem. Soc. 63: 295-298; Di Luzio et al., 1979, Int'l J. Cancer 24: 773-779)]. X線結晶研究においては、微粒子グルカン類が三重らせん鎖 (triple-stranded helices) 形態で存在することが示された [サーコ等., 1983, バイオケミカル ソサイエティ トランスアクション 11: 139~142頁 (Sarko et al., 1983, Biochem. Soc. Trans. 11: 139-142)].

2. 1. 微粒子グルカン類の免疫バイオロジー的活性

微粒子グルカンは、リンパ球刺激と同様にマクロファージ/単核細胞系、姉妹の有効な誘導物質である。このよ

うに、微粒子グルカンは、組織内皮系および免疫系の両者に十分な効果を示した。

以前の研究においては、微粒子グルカンの各種実験動物へのインビロ投与が次のことを含む多くの十分な免疫バイオロジー的応答を誘導することを示した:

(1) 単核細胞およびマクロファージ系の増殖の高値 [デエイマンとファビミ, 1979, ジャーナル オブ イクスペリメンタル メディシン 119: 883~893頁; アッシュワース等, 1963, イクスペリメンタル モレキュラー パソロジー, サプリメント 1: 83~103 (Ashworth and Fahimi, 1979, J. Exper. Med. 149: 883-897; Ashworth et al., 1963, Exper. Molec. Pathol., Suppl. 1: 83-103)];

(2) マクロファージ食作用機能の高値 [リグとジュリオ, 1961, アメリカン ジャーナル オブ ファイオロジー, 200: 297~300頁 (Rigg and Di Luzio, 1961, Am. J. Physiol. 200: 297-300)];

(3) マクロファージ分泌活性の高値 [バーリン等, 1981, イン ヘテロジェニティ オブ モノクリアーファゴサイトス, フォスター アンド ライドイ, エッド., アカデミック プレス, ニューヨーク, 243~252頁 (Berlin et al., 1981, In Heterogeneity of Monoclonal Phagocytes, Foster and Laidy, eds., Academic Press, New York, pp. 243-252)];

(4) マクロファージサイズの増大 [バッチェンとロトソ

特表昭63-500805 (5)

ーバ、1980、イクスペリメンタル ヘマトロジー 3: 409~422頁 (Patchen and Lotzova, 1980, Exper. Hematol. 8: 409~422) ;

(5) マクロファージ付着および走化性誘発の高橋 ニスカネン等、1978、キャンサー リサーチ 38: 1400~1409 (Niskanen et al., 1978, Cancer Res. 38: 1400~1409) ; そして

(6) 補細胞活性の高橋 (グロブスキー等、1983、ジャーナル オブ レティキュロエンドセリアル ソサイエティ 33: 401~413頁 (Glovsky et al., 1983, J. Reticuloendothel. Soc. 33: 401~413)) ; 腫瘍細胞に対する細胞溶解活性の高橋は、インビボ [マンセルとワルジョ、1976、イン サ マクロファージ イン ネオプラシア、フィンク等、アカデミック プレス、ニューヨーク、227~243頁 (Hansell and Di Luzio, 1976, In "The Macrophage in Neoplasia", Fink, ed., Academic Press, New York, pp. 227-243)] およびイン ビトロ [チリゴス等、1978、キャンサー リサーチ 38: 1085~1091頁 (Chirigos et al., 1978, Cancer Res. 38: 1085~1091)] の両者において微粒子グルカン処理された動物およびヒトからのマクロファージ類で示された。

微粒子グルカンのイン ビボ投与による細胞内免疫の刺激は、致死時に放射線照射された動物において典型的または異種間の移植移植片形成を抑制する [例えばワールスと

ワルジョ、1964、プロシーディング ソサイエティ オブ イクスペリメンタル バイオロジカル メディシン 115: 756~759頁 (See, G. G. Noles and Di Luzio, 1964, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 115: 756~759) 参照のこと]。この発見は、正常細胞が過度的にホストと異なるならばグルカンが正常細胞に対してもホスト防御機構を誘導するであろうということを示す。

細胞内免疫および免疫反応の刺激に加えて、微粒子グルカンのインビボ投与は、敗血症の全身衰弱から回復されるより多い顆粒形成、単球形成および赤血球形成を含む造血活性を高めることを示した [パッチェン、1983、サーベイ オブ イムノロジカル リサーチ 2: 237~242 (Patchen, 1983, Surv. Immunol. Res. 2: 237~242)]。

数多くの研究において、微粒子グルカンのインビボ投与は、細菌、菌類、ウイルスおよび寄生体生物により誘導される各種の感染性疾患に対するホスト抵抗性を著しく増進することが示された。特に、感染に対してホスト抵抗性の高橋は、細菌がエシェリキア・コリ (Escherichia coli)、スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus)、フラジセラ・ツラレンシス (Fragiella tularensis)、マイコバクテリウム・レブレ (Mycobacterium lepra), ストレプトコッカス・ニューモニア (Streptococcus pneumoniae)、カンジダ・アルビカンス (Candida albicans)、スポロトリウム・シェンキイ (Sporotrichum schenckii)

のような微小有機体、同様にベネズエラ エキモ エンセファロミエリチス ウィルス (Venezuelan equine encephalomyelitis virus)、リフトバレー熱ウィルス、マウス肝炎ウィルス、フロッグ ウィルスIII (Frog Virus III)、単核ヘルペスIおよびIIのようなウィルス類、およびレイシュマニア ドノバニ (Leishmania donovani) [ワルジョ、1983、トレンドス イン ファーマコロジカルサイエンス、4: 344~347頁 (Di Luzio, 1983, Trends in Pharmacol. Sci. 4: 344~347) およびそこに引用されている文献を参照のこと]のような寄生体類により對抗された場合に見られた。

広範な研究は、微粒子グルカンが有効な免疫増進性を有することを示した。例えば、微粒子グルカンはアデノカルシンノーマ (癌腫) BW10232、アナプラスチック カルシンノーマ (癌腫) 15091A、メラノーマ (黒腫) 316 および自然発生リンパ性白血病B65167 [ワルジョ等、1979、イン アドバンス イン イクスペリメンタル メディシン アンド バイオロジー ボル、121A: 269~280頁 (Di Luzio et al., 1979, In Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 121A: 269~280)] を含む4つの相乗的ネズミ癌モデルにおいて腫瘍成長および長びく生存率を抑制することを示した。

腫瘍細胞の微粒子グルカンの免疫増進性評価のために、対照および微粒子グルカン処理マウスから誘導された腹腔

マクロファージ類の免疫増進細胞溶解活性が研究された [マンセルとワルジョ、1976、イン サ マクロファージ イン ネオプラシア、フィンク等、アカデミックプレス、ニューヨーク、227~243頁 (Hansell and Di Luzio, 1976, In The Macrophage in Neoplasia, Fink, ed., Academic Press, New York, pp. 227-243)]。これらの研究により、グルカン処理マウスからの腹腔マクロファージ類は正常なマクロファージ類に比較して顕著な細胞溶解活性を産生することが示された。この観察が確認された [例えば、バーリン等、1981、イン ヘテロジェニティ オブ モノニュークリアー ファゴサイトス、フォルスター アン ド ランディー、エド アカデミック プレス、ニューヨーク、243~252頁およびチリゴス等、1978、キャンサー リサーチ 38: 1085~1091頁 (See, G. G. Berlin et al., 1981, In Heterogeneity of Mononuclear Phagocytes, Ferster and Landy, eds., Academic Press, New York, pp. 243-252) and Chirigos et al., 1978, Cancer Res. 38: 1085~1091) 参照のこと]

次に微粒子グルカンでインキュベートした巨噬、腫瘍細胞を使用するインビトロ研究は、グルカンが肉腫および癌 (色) 腫瘍細胞に直接細胞増殖抑制効果及ぼし、かつ、正常細胞および腫瘍細胞に増殖効果及ぼすことを示した [ウィリアムス等、1985、ヘパトロジー、5: 198~206 (Williams et al., 1985, Hepatology, 5: 198~206)]。

これらの研究は、治療で扱われた場合に研究されたグルカンが、恐らくは肉腫細胞に対するかかるグルカンの産生細胞増殖抑制効果と同様に増大したクッパー細胞の抗癌活性により(1)肝転移を顕著に抑制し;(2)初期癌成長を抑制しそして(3)生存率を高めるであろう。

これらのバイオロジック特性にもかかわらず、微粒子グルカン類の反対である副作用がこれらの化合物をほとんど臨床試験において無効となした。

2. 2. 微粒子グルカン類の反対の副作用

微粒子グルカン類が動物にインビボ投与された場合に多くの反対の副作用が明らかとなり、その中でもっと注目すべきは次のようなものであった:

- (1) 肉芽腫形成(サイコイドーシス);
- (2) 肝脾腫大症候群;
- (3) グラム陰性感染および(菌体)内毒素に対する感受性の増大;
- (4) 肺体の活性化[アナフィラトキシン(anaphylatoxin)];
- (5) 肺内芽生枝菌肺炎の成長;
- (6) 肺内投与後の低血圧化;
- (7) 高濃度投与の割合の微小血栓症の成長。

更に、微粒子グルカンがインビボ投与される際に相対的に高度の急性毒性が観察される。例えば、高濃度グルカンの水性懸濁液の単一静脈注射後、20%と100%死亡

率(mortality)は、250と500mg/体重のグルカンそれぞれ受容するマウスで観察された。

その上、グルカン製剤の微粒子特性(1-3 μ)のために静脈ルート經由投与が困難である。制剤によれば、微粒子グルカン類を受けるある患者は、静脈(IV)投与の副産物形成を避けるために微粒子グルカンを懸濁液として保持するために必要である静脈(IV)点滴を連続的に投与するという一定の管理を必要とした。

若く可溶性の中性グルカン類が市販されているけれども、これらの製剤は、水溶液が濃粘度であり、そして更に重要なことに、実験動物に投与された時にその投与は必然的にかなりの毒性を伴うため、静脈投与に適していない。

レンチナン、即ち高分子量であり、シイタケ(Lentinus edodes)から得られた難溶性 β -1, 3および β -1, 6グルカン、は犬への静脈投与について調製された。多くの逆の臨床結果は、レンチナン用量2, 0, 8, 0および30mg/kg/日で5週間(味の素(株)、東京、日本国)の投与から観察された。逆の結果は、嘔吐、気喘、四肢の発色および顔面はれを含んでいた。循環虚脱、不安定歩行、変異行動パターン余分の唾液が出ることも個々のビーグル犬において観察された。、死体解剖において腎臓虚脱のうっ血が2, 0または8, 0mg/kg/日処置動物で観察された。肝臓の形態の変化は、肝臓細胞中に蓄積された内部細胞形質崩壊、多分レンチナン、を示した。ある動物は、8,

0mg/kgの投与の最初の注射の際に循環虚脱を示した。回復したが、経験動物は胃腸管の出血を示す血液の存在を有する嘔吐エピソードを繰り返した。他の動物は、顔面の紅斑および皮下のはれ(水腫)により示されるように器質的アレルギー反応を示すように思われた。死体解剖において皮下組織の広範囲の水腫および出血を有する胃腸管のうっ血が見出された。マクロファージ細胞は、物質の蓄積、多分レンチナン、を示した[チエスターマン等、1981、トキシコロジカル レター 9: 87-90頁(Chesterman et al., 1981, Toxicol. Lett., 9: 87-90)]。

0, 1-1, 0mg/kg/日範囲の各種用量のレンチナンを静脈を通じてラットに9週間与えるさらなる急性研究が実施された。毒性は、皮膚外腫の成長および血栓症候群の事実を示唆する耳の発色により示された[コーゼン等、1981、トキシコロジカル レター 9: 55-64(Cohen et al., 1981, Toxicol. Lett., 9: 55-64)]。

2. 3. 可溶性微粒子グルカン類に対する前めの失敗

微粒子 β -1, 3グルカン類のインビボ投与の不利さに迫って非毒性、何ら重要な薬理作用を誘導せず、さらに重要な免疫バイオロジック的活性を有する可溶性 β -1, 3ポリグルコース開発の広範な研究が行われた。

微粒子グルカンの酸加水分解により製造された低分子重率リン酸化可溶性グルカン製剤は、抗癌薬および抗スタフィロコッカス活性を示した[シルジオ等、1979、イ

ンターナショナル ジャーナル オブ キャンサー 24: 773-779頁(1) Luzio et al., 1979, Internat'l J. Cancer 24: 773-779)。不確な事に、この方法により得られたフラクションの低収量および多様性は、この製剤を予防および治療への適用を有効でないものとした[シルジオ、1983、トレンド イン ファーマコロジカル サイエンス 4: 344-347頁(1) Luzio, 1983, Trends in Pharmacological Sciences 4: 344-347) 参照のこと]。

同様に、ジメチルスルホキシド(DMSO)「分子溶解剤」の添加による微粒子グルカンを可溶化する試みも不成功であった。DMSOはグルカン分子の三重らせん立構配座を壊めると考えられていた。事実、微粒子グルカンはDMSOの存在下で溶解する。DMSO溶液から可溶性グルカンを沈澱する試みの全ては、しかしながら、失敗した。DMSO-グルカン溶液をグルコースおよび塩化ナトリウム(saline)溶液のような各種水性媒体で希釈すると微粒子グルカンが再形成された。DMSO-可溶性グルカン溶液を塩化ナトリウムで希釈した後、これら溶液の注射を受ける動物の全ては高濃度DMSOまたは微粒子グルカンの再形成のため注射後直ちに死亡した。

エタノール(100%)添加によりグルカンがDMSO中に沈澱すると、沈澱物は集められ、凍結乾燥された。この凍結乾燥グルカンが水中に投入されると、微粒子グルカン

が再形成した。

アセチル化と同様にホスフェートまたはサルフェート基の添加により微粒子グルカンの中性グルカン製剤を慢性免疫製剤に変える試みも失敗した。これら工程の各々は微粒子グルカンの溶解後DMSOにより制御され、各例において微粒子グルカンは再形成された。

3. 発明の要約

グルカンの三重らせん鎖が様々な反応を許容するよう十分に抱める方法の徹底的な研究の間に、微粒子グルカンが（酸素のような）強いオキソトロピック剤の存在下において（DMSOのような）高極性溶液中溶解する際に、グルカンは構造的に十分に分裂させられて各単位（またはストランド）の各々のリン酸化反応を許容し、生じたリン酸化グルカンは微粒子グルカンの特性三重らせん構造が実質的に完全に存在しないことを示した。生じたリン酸化グルカンの除去は、水に溶解すること、非毒性、非免疫原性、実質的な非発熱性および動物およびヒトにインビボ投与される時に顕著な免疫バイオリジック的反応を行うことを示す。

これらの発見に基づいて本発明は、(a) ポリ[β-(1→3)-グルコピラノース]鎖がさまざまな程度にリン酸化され；(b) 非毒性、非免疫原性、実質的な非発熱性；および(c) 動物およびヒトにインビボ投与された場合に顕著な免疫バイオリジック的反応をすることができる新規なクラスの可溶性リン酸化グルカン類を提供する。これら新

規な可溶性リン酸化グルカン類は、さらに微粒子グルカン類の三重らせん構造の実質的な不存在、親細胞内伝達および免疫系の他の免疫活性細胞の活性化を促させる免疫刺激マクロファージ活性により特徴づけられる。更にこれら可溶性リン酸化グルカン類は、それに限定されないが、白血球生成を含む造血性を高める。これら可溶性リン酸化グルカン類は、インビボで除菌および肉腫に対し、インビトロでリンパ性白血病に対して腫瘍増殖抑制効果を示す。これら可溶性リン酸化グルカン類はインビボでマクロファージ細胞を刺激するばかりでなく、インビトロ培養化マクロファージ細胞に顕著な刺激効果を與へる。マクロファージ細胞のかかる免疫刺激は、マクロファージ細胞毒性/細胞増殖抑制因子(MCT)、選択的に癌細胞、特に癌腫に毒性である末梢構造のタンパク質またはタンパク質類の生産を必須的に伴う。

加えて、本発明は（他の微生物類を使用してもよいが好ましくはセッカロミクスセレビシエから生産された）微粒子グルカンを強力オキソトロピック剤を含む高極性溶液中に溶解し、生じたグルカンをリン酸と反応させて可溶性リン酸化グルカンを形成させ、そして反応混合物から生じたリン酸化グルカン類を回収するこれら可溶性リン酸化グルカン類を調製する方法を提供する。

更に、本発明は、細菌、菌類、ウイルス類および寄生性動物により誘導された感染を可溶性リン酸化グルカンま

たは動物またはヒトに生理学的に許容可能な担体と組合せた可溶性リン酸化グルカンから成る製剤組成物を投与することによる治療および予防に用いる方法を提供する。その上、それらの方法はそれらの担体により誘導された感染の治療に適用し、その感染に対して有効なバイオ活性剤と組合せた有効量の可溶性リン酸化グルカンを投与することにより提供される。

その上、本発明は治療上有効量の可溶性リン酸化グルカン単独または担体と組合せて動物またはヒトに投与することにより悪性新生疾患の処置方法を提供する。本発明は、同様に、抗癌剤と組合せて有効量の可溶性グルカン類を動物またはヒトに投与することにより、抗癌剤の投与により誘導された白血球減少症の予防方法を提供する。

更に、本発明は動物およびヒトマクロファージ細胞を刺激して可溶性細胞毒性/細胞増殖抑制因子(MCT)を合成・分泌する方法およびそのように調製された生薬物を提供する。特に、MCTは可溶性リン酸化グルカンを動物またはヒトに投与若しくは動物またはヒトマクロファージ細胞を可溶性リン酸化グルカンを含む培養媒体中でインビトロで培養することにより調製される。

本発明の可溶性リン酸化グルカン類の特性は、

(1) グラム陰性細菌感染を抑制し死亡率を削減させる効能；(2) グラム陰性細菌感染を抑制し死亡率を削減させる効能；(3) 顕著に免疫抑制された動物およびヒトにお

ける癌発生感度から死亡率を削減する効能；(4) グラム陰性細菌感染に対する免疫抑制された動物およびヒトの感受性の高揚を加減する効能；(5) ウイルス感染を顕著に加減する効能；(6) 菌類および他の表生体有菌類により誘導された自然発生感染を加減する効能；(7) 単独で使用した場合に初期腫瘍成長を顕著に抑制し、抗癌剤と組合せて使用された場合に初期腫瘍成長に対し相乗効果を及ぼす効能；(8) 動物およびヒトの転移外傷と同様に初期癌外傷の退行に抗癌剤と相乗的に作用する効能を含む。

これらの独特の特性のため可溶性リン酸化グルカン類は、多くの病態条件と同様に、細菌、ウイルス、菌類および寄生性動物により誘導された各種の疾病に対し予防および治療上の適応に特に有効である。可溶性リン酸化グルカン組成物は、生理学的に許容可能な製剤媒体とともに、単独または他のバイオ活性または薬学的に作用する製剤および治療法と組合せて有効に使用してもよい。

4. 簡便図面の説明

本発明は、次の本発明の図面を説明、本発明の実施態様および添付の図を参照してさらに十分理解されるであろう。

第1図は、27℃/24時間における可溶性リン酸化グルカンの殺菌気相場スペクトル図である。

第2図は、菌種のレンチナン製剤（味の素（株）製、日本国）の殺菌気相場スペクトル図である。第2A図は、

40%の濃度において得られたスペクトル図である。第2図は、3%のペレンチニン濃度において得られたスペクトル図である。

第3図は、過2回可溶性リン酸化グルカン注射を受けたコレラコレロイド免疫抑制マウスの生存効果を示す図である。同時に第3図は正常なマウスの生存率に対して可溶性グルカンの投与量と結果を示す。

第4図は、正常およびコレラコレロイド免疫抑制マウスのエシェリキアコリ (Escherichia coli) 感染菌の可溶性リン酸化グルカンのインビボ投与と結果を示す図である。

第5図は、その疫病的に誘導されたスタフィロコッカス・アウレウス感染の致死効果に対する可溶性リン酸化グルカンの投与量と結果を示す図である。

第6図は、その疫病的に誘導されたウィルス性肝炎マウスの生存率に対する可溶性リン酸化グルカンを用いる前の処理結果を示す図である。

第7図は、実験的に誘導されたカンジダ・アルビカンズ感染マウスの生存率に対する可溶性リン酸化グルカンの投与量と結果を示す図である。

第8図は、インターロイキンI産物に対する可溶性リン酸化グルカンの効果を示す図である。

第9図は、可溶性リン酸化グルカン活性化マクロファージ培養から得られた癌細胞増殖抑制/細胞増殖抑制因子が分子重量3,500および84,000ダルトンの二つ

の主要なフラクションから成ることを示す図である。

5. 本発明の詳細な説明

5. 1. 可溶性リン酸化グルカンの調製方法

水性可溶性リン酸化グルカンは、前記のいずれの他のグルカン類と異なる唯一のクラスを生ずる方法によって調製される。

本発明の好適な実施形態に従って可溶性リン酸化グルカンは次のように調製される：サッカロミセスセレビシェから誘導された中性ポリグルコースである微粒子グルカンは、一定に攪拌しながらジメチルスルホキサイド (DMSO) のような非プロトン性 (aprotic) 溶媒中の強カオトロピック剤溶液中で懸濁せられる。強カオトロピック剤は、ポリグルコース鎖に於いて水素結合を断ち、そして分子を保持しない。水素結合の再形成防止のため約4〜12Mの範囲の濃度のようにならり高濃度の強カオトロピック剤を使用することが好ましい。その混合物を、その後、約50〜150℃で加熱し、保持し、一定に攪拌しながらリン酸を徐々に加えた。可溶性リン酸化グルカン生成物から成る懸濁液は約1時間後明らかとなる。バイオ活性生成物の収量増加のため約100℃で約3〜12時間反応混合物を保持することが好ましい。実際に、約100℃で約6時間の反応後、収量は約70〜90%である。可溶性生成物のリン酸化度は反応時間で若干変化する (例えば、3時間で1、48%、6時間で2、23%)。

バイオ活性可溶性リン酸化グルカン生成物は、次のように反応混合物から単離される：その混合物はリン酸化反応停止のために冷却され、沈降物を再懸濁するために十分量の蒸留水で希釈される。生じた懸濁液は、どのような残留液、固形物除去のため粗、中間、微細な沈降ロートを通して濾過される。その溶液は、その後、約10,000ダルトン分子重量 (MW) より小さい成分の全てを除去するためにモレキュラーシーブにかけられた。このように、DMSO、廃棄物、グルコースおよび未反応リン酸はその懸濁液から除去される。モレキュラーシーブは、これらの低分子 (すなわち、約10,000ダルトンより小さい) MW成分を除去するいかなる方法によっても達成される。ある例証においてその溶液は、約5日間減圧蒸留水に対してスペクトロポーター (Spectraport) メンブラン透析装置および透析を用いて精製される。他の例証においてその溶液は、10,000ダルトンMWメンブランフィルターおよび大容量透析装置を有するミリポア (Millipore) ダイアライザー/コンセンتراتを使用して精製される。モレキュラーシーブにかけた後、生じた溶液は希塩のような終末組成物形態の最終可溶性リン酸化グルカンを調製するために凍結・凍結乾燥される。結晶構造は観察されない。

本発明従つ可溶性リン酸化グルカンの調製方法において使用した微粒子グルカンは、既知の方法によりサッカロミセスセレビシェ細胞壁から単離されるであろう (例えば、

ジュルシオ等., 1979, インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー 24: 773~779頁; 引例として含まれたハッシュド等., 1941, ジャーナル オブ アメリカン ケミカル ソサイエティー 63: 295~298頁を参照のこと (see e. g., Di Luzio et al., 1979, Internat'l J. Cancer 24: 773~779; Hassid et al., 1941, J. Amer. Chem. Soc. 63: 295-298 incorporated herein by reference).]。簡単に、実験は微粒子グルカンは、次のように調製される：乾燥イーストは、水酸化ナトリウム水溶液中で消化され、約100℃で約4時間加熱され、そして一夜保持される。上澄液はデカントされ、その工程は3回繰り返される。懸濁液はHClを使用して酸性化され、加熱され、100℃で約4時間保持され、そして1夜冷却される。上澄液はデカントされ、懸濁液は2回繰り返される。その懸濁液は、その後、蒸留水で繰り返し洗浄され、エタノールで少なくとも24時間抽出される。赤褐色上澄液はその後アスピレートされ、捨てられる。エタノール抽出は、上澄液が本質的に無色となるまで繰り返される。エタノールは、蒸留水で残留物を繰り返し洗浄することにより除去される。微粒子グルカンは遠心分離または濾過により集められる。

「分子凝縮剤」として作用することが知られている炭素以外の多くの化合物も、DMSOが微粒子グルカンの三重らせん立構配座を断ち切るために使用された後、水素結合の